

بررسی اثر واریکوسلکتومی بر پارامترهای اسپرمی، سلامت غشا و تراکم کروماتین آن

محمد حسین نصرافهانی Ph.D.*[‡]، زین الدین بهدادی پور Ph.D.*، همایون عباسی M.D.*[‡]
فرزانه زمان سلطانی M.Sc.*، محمد مردانی Ph.D.*، بهشته ابوحمزه M.Sc.*

* مرکز باروری و ناباروی اصفهان و عضو هیئت علمی پژوهشکده رویان

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم نشریح

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ارولوژی

[‡] آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

هدف: بررسی تأثیر واریکوسل و واریکوسلکتومی بر پایداری کروماتین، سلامت غشا و برخی پارامترهای اسپرمی

مواد و روشها: در این بررسی ۲۰ بیمار مبتلا به واریکوسل با گریده سه بررسی شدند، پارامترهای اسپرمی همراه با رنگ آمیزی آنیلین بلو برای بررسی میزان تراکم کروماتین هسته اسپرم و تست تورم (HOST: Hypo-Osmotic Swelling Test) برای بررسی سلامت غشا قبل از عمل جراحی و ۴۵ و ۹۰ روز بعد از عمل جراحی مطالعه شد.

یافته‌ها: بررسی اطلاعات نشان‌دهنده بهبودی در غلظت کل اسپرم و مرفولوژی طبیعی و همچنین پایداری کروماتین اسپرم پس از عمل جراحی است ولی در میزان تست تورم (هایپواسموتیک) و حرکت اسپرم قبل و بعد از واریکوسلکتومی تغییری دیده شد.

نتیجه‌گیری: واریکوسل باعث اختلال در پارامترهای اسپرمی و تراکم کروماتین اسپرم می‌شود ولی در مورد تراکم کروماتین، این اختلال تا حد ایجاد ناباروری نیست و به سلامت غشای اسپرم در واریکوسل آسیبی نمی‌رسد. واریکوسلکتومی باعث بهبودی پارامترهای اسپرمی و همچنین تراکم کروماتین اسپرم شده و احتمالاً باعث افزایش باروری و میزان لقاح می‌شود.

کل واژگان: واریکوسل، پارامترهای اسپرمی، تست تورم (هایپواسموتیک)، تراکم کروماتین اسپرم

مقدمه

واریکوسل به اتساع و پیچشی شدن غیر طبیعی وریدهای شبکه پامپینی فرم در طناب اسپرماتیک در بالای بیضه اطلاق می‌شود (۱). این اختلال در ۱۰ تا ۲۰ درصد از جمعیت بالغین یافت می‌شود (۲، ۳) و نیز یکی از علل شایع شناخته شده ناباروری مردان محسوب می‌شود؛ به طوری که در ۳۰ تا ۴۰ درصد مردان نابارور، واریکوسل وجود دارد (۱، ۲، ۳). از طرفی، به عنوان شایعترین علت قابل درمان ناباروری مطرح است (۴). در بیماران واریکوسل، اختلال در جریان خون بیضه باعث افزایش درجه حرارت آن شده که به دنبال آن تغییراتی در اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرمی دیده می‌شود (۵). این بیماری باعث اختلال در کیفیت مایع سمینال شده و شایع‌ترین یافته در این زمینه کاهش حرکت اسپرم در ۹۰ درصد بیماران است. همچنین در ۶۵ درصد بیماران، غلظت اسپرم به کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر می‌رسد. مرفولوژی غیرطبیعی در این بیماران نیز شایع است (۵).

پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت، حرکت و مرفولوژی در آنالیز اسپرم به عنوان شاخصهای لقاح مشخص شده‌اند ولی بعضی از متخصصین بر این باورند که به جز در مورد محدودی، پارامترهای فوق به تنهایی برای پیش بینی لقاح کافی نیست (۶). لذا به علت کافی نبودن ارزش پیشگویی این پارامترها، لازم است در بررسی پارامترهای اسپرم، تستهای عملکرد اسپرم^۱ نیز بررسی شود. از میان این تستها می‌توان به بررسی پایداری یا تراکم کروماتین هسته و سلامت یا Integrity غشای اسپرم اشاره کرد.

با توجه به این که واریکوسل ممکن است علاوه بر ایجاد اختلال در پارامترهای اسپرمی، تستهای عملکردی اسپرمی را نیز تحت تأثیر قرار داده و ایجاد ناباروری کند، در این بررسی که بر روی بیماران واریکوسل انجام شده است علاوه بر پارامترهای اسپرمی، تستهای فوق‌الذکر نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. که در این جا به اختصار در مورد هر یک از این تستها توضیح داده می‌شود.

وضعیت سلامت غشای اسپرم توسط تست تورم (هایپواسموتیک) بررسی می‌شود؛ این تست توسط Jeyendran همکارانش در سال ۱۹۸۴ به عنوان تستی سودمند برای تشخیص ناباروری معرفی شد (۷). اساس این تست بر انتقال مایع از عرض غشای دم اسپرم تحت شرایط هایپواسموتیک تا برقراری تعادل است که در نتیجه نفوذ مایع به درون سیتوپلاسم، دم متورم و متسع می‌شود (۷). در صورتی که اسپرم مرده باشد یا غشای آن آسیب دیده باشد، تورم در دم رخ نمی‌دهد و این محققین پیشنهاد نموده‌اند که اگر بیش از ۵۰ درصد اسپرمهای یک نمونه تورم و خمیدگی در دم را نشان ندهند این تست غیرطبیعی گزارش شود (۸).

برخی از گزارشها نشان‌دهنده وجود ارتباط بین درصد پاسخ مثبت در این تست با میزان بروز حاملگی و لقاح آزمایشگاهی است و به همین دلیل آن را به عنوان یک روش سودمند برای ارزیابی وضعیت باروری مرد می‌دانند اما در مقابل، گروهی دیگر از محققین نظرات مخالفی داشته و در مورد اعتبار آن تردید دارند (۷).

پایداری یا تراکم کروماتین هسته به روشهای مختلفی بررسی

می‌شود و یکی از این روشها، روش رنگ آمیزی با آنیلین بلو است و ارتباط مستقیمی بین میزان باروری مردان و رنگ‌پذیری اسپرمها با آنیلین بلو مشاهده شده است.

مواد و روشها

بررسی بر روی ۲۰ بیمار دارای واریکوسل با گرید سه انجام شد. کلیه بررسیهای انجام شده بر روی بیماران قبل از عمل جراحی و همچنین ۱/۵ و ۳ ماه پس از عمل واریکوسلکتومی صورت گرفته است. مایع سمینال در ظرف مخصوص جمع‌آوری شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا فرآیند مایع شدن در آن رخ دهد.

پارامترهای اسپرمی

پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت اسپرم (میلیون در میلی‌لیتر)، حرکت اسپرم (درصد) مرفولوژی (درصد انواع غیرطبیعی) در مورد هر نمونه انجام گرفت. غلظت اسپرم با استفاده از یک لام Makler شمارش شد و مرفولوژی با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولاو و حرکت اسپرم نیز با روش مرسوم و با مشاهده مستقیم به وسیله یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ انجام شد و درصد اسپرمهای بدون حرکت، (P_1)، اسپرمهای با حرکت در جا (P_2) اسپرمهای با حرکت پیشرونده (P_3+P_4) محاسبه شد (۱۰).

تست تورم هایپواسموتیک (HOST)

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر مایع سمینال را در ۱ میلی‌لیتر محلول هایپواسموتیک ۱۵۰ میلی اسمول در لیتر کلرید سدیم ریخته و نیم ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد (۱۱). سپس اسپرمها در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه و مطابق با استاندارد WHO، درصد هفت نوع پاسخ مختلف (HOST) یعنی از a تا g تعیین شد (۷).

پایداری کروماتین اسپرم

یکی از روشهای بررسی پایداری کروماتین اسپرم رنگ آمیزی آنیلین بلو است. در اسپرمهایی که در طی اسپرمیوژنز، هیستونهایشان توسط پروتامین جایگزین نشده است در این رنگ آمیزی هیستونها که دارای مقدار زیادی اسید آمینه لیزین هستند به رنگ آبی در آمده و می‌تواند این اختلال را مشخص نماید (۹). بررسیهای انجام شده نشان‌دهنده وجود ارتباط مستقیم و معنی‌دار بین درصد پایداری کروماتین اسپرم و میزان لقاح آزمایشگاهی است (۹).

برای تهیه آنیلین بلو ۵ درصد، ۵ گرم آنیلین بلو به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر استات با $\text{pH}=3/5$ افزوده شد (۱۳). گسترشهای تهیه شده از نمونه‌های بیماران با آنیلین بلو رنگ آمیزی شده و درصد اسپرمهای بی‌رنگ (G_0 =گرید صفر)، اسپرمهای نیمه رنگ شده (G_1 =گرید یک) و اسپرمهای کاملاً رنگ شده (G_2 =گرید دو) مشخص شد و سپس

واریکوسلکتومی نسبت به قبل آن دیده می‌شود. در جدول ۳ ملاحظه می‌شود که پس از عمل جراحی در پاسخ مثبت کلی و همچنین انواع مختلف پاسخها (HOST) تغییر معنی‌داری دیده نمی‌شود.

Total Score به این ترتیب به دست آمد:

$$(G_0 \times 0) + (G_1 \times 1) + (G_2 \times 2)$$

یافته‌ها

نتایج به دست آمده در ۳ جدول به شرح زیر ارائه شده است: بررسیها با استفاده از نرم‌افزار Spss-Windows و روش آماری Paired Students t test انجام شد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در

بحث

بهبودی در پارامترهای اسپرمی و باروری در پی بستن ورید به روش جراحی یا انسداد آن به روش آنژیوگرافی بویژه در جراحی

جدول ۱: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی

مراحل بررسی	غلظت مراحل	درصد حرکت کل	درصد حرکت پیشرونده	درصد انبساط کلی
قبل از جراحی ^①	۱۰۹/۸۲ ± ۱۳۳/۲	۳۷ ± ۲۵/۲	۲۷/۸۶ ± ۲۴/۹۳	۵۸/۶۶ ± ۱۷/۷۸
۱/۵ ماه بعد از جراحی ^②	۱۷۶/۳۱ ± ۱۸۵/۸	۵۱/۰۶ ± ۲۱/۰۹	۳۵/۱۳ ± ۱۹/۵۶	۵۲/۵۳ ± ۱۶/۴۶
۳ ماه بعد از جراحی ^③	۲۱۲/۶ ± ۱۵۲/۶	۵۷/۳ ± ۲۲/۱۶	۴۰/۲۶ ± ۲۲/۳۳	۳۹/۸۰ ± ۱۲/۵۸
مقایسه قبل از جراحی و ۱/۵ ماه پس از جراحی Students T test	۲/۲۲	-۰/۹۲	۱/۸۲	۲/۱۵
P-value	N.S.	N.S.	N.S.	< ۰/۰۵
مقایسه قبل از جراحی و ۳ ماه پس از جراحی Students T test	۳/۳۲۵	-۱/۹۸	-۱/۹۲	۳/۶۷
P-value	< ۰/۰۵	N.S.	N.S.	< ۰/۰۵

N.S. = Not Significant

* انحراف معیار ± میانگین

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های مربوط به پایداری کروماتین اسپرم

مراحل بررسی	میانگین G ₀	میانگین G ₁	میانگین G ₂	Total Score میانگین
قبل از جراحی ^①	۴۷/۳۳ ± ۱۸/۰۶	۴۷/۹۳ ± ۱۲/۵۶	۴/۸۲ ± ۵/۰۲	۵۷/۵۹ ± ۲۱/۶۹
۱/۵ ماه بعد از جراحی ^②	۵۰/۳ ± ۱۸/۸۹	۳۵/۷ ± ۱۵/۷۶	۴/۰۷ ± ۲/۵۱	۵۷/۰۶ ± ۲۰/۳۶
۳ ماه بعد از جراحی ^③	۶۴/۳ ± ۲۰/۵۱	۳۳/۵۳ ± ۱۸/۳۸	۲/۱۰ ± ۲/۹۳	۳۷/۷۲ ± ۲۲/۵۷
مقایسه قبل از جراحی و ۱/۵ ماه پس از جراحی Students T test	-۰/۳۱	-۰/۸۳	-۰/۰۹	۰/۵۷
P-value	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
مقایسه قبل از جراحی و ۳ ماه پس از جراحی Students T test	-۰/۳۲	۲/۲۳	۴/۳۵	۲/۸۲
P-value	< ۰/۰۵	< ۰/۰۵	< ۰/۰۵	< ۰/۰۵

N.S. = Not Significant

* انحراف معیار ± میانگین

جدول ۳: مقایسه میانگین انواع پاسخهای تورم هایپوسموتیک

مراحل بررسی	Total Reaction	Subtype a	Subtype b	Subtype c	Subtype d	Subtype e	Subtype f	Subtype g
قبل از عمل جراحی	۸۱/۰۷ ± ۵/۵۹	۱۸/۹۲ ± ۵/۵۹	۱۹/۶ ± ۳/۵۶	۹/۶ ± ۴/۰۱	۱/۶ ± ۱/۲۹	۱۲/۶۶ ± ۵/۲۲	۱۰/۸۶ ± ۳/۸	۲۲/۲۲ ± ۵/۸۶
۱/۵ ماه بعد از عمل جراحی	۸۰/۷۳ ± ۶/۷۸	۱۹/۲۶ ± ۶/۷۸	۲۰/۱۳ ± ۴/۶۷	۸/۱۵ ± ۴/۶۷	-۰/۹۳ ± ۰/۹۶	۱۲ ± ۲/۵۲	۱۴/۱۳ ± ۲/۴	۲۴/۳۰ ± ۷/۳۱
۳ ماه بعد از عمل جراحی	۸۲/۲۶ ± ۴/۶۲	۱۶/۷۲ ± ۴/۶۲	۱۸/۲۶ ± ۵/۵	۹/۷۳ ± ۳/۶۹	۱/۲ ± ۱/۲۶	۱۴/۱۳ ± ۵/۳۳	۱۴/۲۶ ± ۴/۶	۲۶/۵۳ ± ۴/۱۲
مقایسه قبل از جراحی و ۱/۵ ماه پس از جراحی Students T test	۰/۳۲	-۰/۳۲	-۰/۳۷	-۱/۰۳	۱/۷۳	-۰/۸۸	-۳/۰۵	-۰/۰۴
P-value	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	< ۰/۰۵	N.S.
مقایسه قبل از جراحی و ۳ ماه پس از جراحی Students T test	-۱/۶۸	۱/۶۸	۰/۷۴	-۰/۱۲	۰/۷۸	-۰/۵۱	۲/۳۵	-۱/۲۵
P-value	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	< ۰/۰۵	N.S.

N.S. = Not Significant

* انحراف معیار ± میانگین

زود هنگام واریکوسلهای بزرگ دیده شده است. اخیراً نتایج یک مطالعه روی تأثیرات بلندمدت درمان واریکوسل در سن بلوغ نشان داده است که اصلاح زود هنگام واریکوسلهای بزرگ دیده شده است. اخیراً نتایج یک مطالعه روی تأثیرات بلندمدت درمان حد

جدول ۱ به جز حرکت، بقیه پارامترها افزایش معنی‌داری را در ۱/۵ و ۳ ماه پس از جراحی نشان می‌دهند. همچنین در جدول ۲ نشان داده شده است که تفاوت معنی‌داری در تراکم کروماتین اسپرم به روش آنیلین بلو در سه ماه بعد از

ایجاد نکرده و در نتیجه واریکوسلکتومی نیز تفاوتی در وضعیت سلامت غشا به وجود نمی آورد.

Jeyendran و همکارانش معتقد بودند که HOST یا پارامترهای اسپرمی مرتبط است؛ در حالی که دیگران در بررسیهای وسیعتری که انجام داده‌اند ارتباط بالارزشی را گزارش نکرده‌اند (۱۶).

پارامترهای اسپرمی پس از واریکوسلکتومی تغییر معنی‌داری را نشان دادند در حالی که هیچ ارتباط معنی‌داری بین واریکوسل و واریکوسلکتومی با HOST دیده نشد. لذا این نتایج ارتباطی بین پارامترهای اسپرمی و HOST را نشان نمی‌دهند.

همان‌طور که قبلاً ذکر شد در مورد قدرت پیش‌بینی وضعیت باروری فرد و همچنین میزان حاملگی و لقاح آزمایشگاهی توسط HOST اختلاف نظر وجود دارد. با توجه به نتایج این بررسی می‌توان چنین نتیجه گرفت که HOST برای پیش‌بینی وضعیت باروری فرد چندان مفید نبوده و همچنین با میزان حاملگی نیز ارتباطی ندارد.

بررسی پایداری کروماتین نیز یکی دیگر از تستهای مطرح است. در بررسیهایی که توسط Hofman و Doudonne روی بیماران نابارور و بارور انجام شد، چنین گزارش شد که یک نمونه طبیعی کمتر از ۷۵ درصد رنگ‌پذیر است (۹). بررسیهای دیگری که در این زمینه انجام شده نشان داده است که در صورتی که اسپرمهای رنگ گرفته شده با آنیلین بلو بیش از ۳۰ درصد اسکور G۲ داشته باشند. میزان لقاح به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد.

چون میزان رنگ‌پذیری اسپرمها قبل از عمل جراحی کمتر از ۷۵ درصد است و درصد G۲ در کلیه بیماران بسیار کمتر از ۳۰ درصد است؛ لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که اگرچه پایداری کروماتین اسپرم با انجام واریکوسلکتومی به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد ولی کاهش درصد لقاح که در واریکوسل ملاحظه می‌شود، نمی‌تواند تنها در ارتباط با کاهش پایداری کروماتین در اسپرم باشد، زیرا میانگین میزان پایداری کروماتین قبل و بعد از عمل به اندازه میانگین آن در بیماران بارور است.

همچنین ملاحظه می‌شود که جراحی باعث بهبودی پایداری کروماتین اسپرم می‌شود. این بهبودی در مرفولوژی نیز ملاحظه می‌شود. لذا با توجه به وجود ارتباط معنی‌دار و ضریب همبستگی بالا بین پایداری کروماتین و مرفولوژی، تغییر در پایداری کروماتین می‌تواند مستقیم یا غیرمستقیم بر بهبودی مرفولوژی بر لقاح و در نهایت باروری اثر بگذارد.

طبیعی می‌شود (۲). نتایج به دست آمده در این تحقیق در مورد واریکوسل باعث افزایش حجم بیضه‌ها و بازگشت کیفیت سیمین به غلظت و همچنین مرفولوژی اسپرمها یافته‌های Haidl (۱۲)، Lenzi (۲) هماهنگی دارد.

غلظت اسپرم و مرفولوژی، یک ماه و نیم پس از جراحی نیز افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد، از آنجایی که اسپرمیونز حدود ۷۴ روز به طول می‌کشد، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عمل جراحی بر روند اسپرماتوژنزی که در همان زمان در حال پیشرفت بوده است نیز تأثیری مثبت گذاشته است؛ اما توضیح منطقی برای افزایش قابل توجه غلظت پس از عمل، امکان وجود انسداد نسبی در بیماران واریکوسل است. وریده‌های منسج شده در بیماران واریکوسل می‌تواند باعث انسداد نسبی و متناوب لوله‌های مستقیم و مجاری آوران بیضه شوند (۱۴). با رفع واریکوسل این انسداد نسبی برطرف شده و در نتیجه غلظت اسپرم، افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد. اگرچه نتایج این تحقیق در مورد حرکت، ارتباط معنی‌داری را در قبل و بعد از عمل جراحی نشان نداده است ولی میانگین‌های به دست آمده در هر مرحله افزایش در میزان حرکت را نشان می‌دهد. این نتایج با یافته‌های Haidl (۱۲) هماهنگی دارد ولی با نتایجی که Lenzi (۲) به دست آورده است که وجود ارتباط معنی‌داری را نشان می‌دهد، هماهنگی ندارد. یکی از دلایل این عدم هماهنگی می‌تواند به علت تفاوت زمان بررسی باشد، به این معنی که تحقیق حاضر و بررسی Haidl در مدت کوتاهی پس از جراحی صورت گرفته (این تحقیق ۳ ماه و تحقیق Haidl ۶ ماه پس از جراحی) ولی Lenzi نتایج خود را در طی ۲-۸ سال پس از جراحی به دست آورده است. اخیراً مرفولوژی به عنوان مهمترین فاکتور در بررسی لقاح عنوان شده است (۱۵). در افرادی که درصد اسپرم‌های غیرطبیعی بالایی دارند، درصد اسپرم طبیعی که ممکن است در زناشویی طبیعی به تخمک برسند کاهش می‌یابد. در نتیجه با توجه به کاهش اسپرمهای غیرطبیعی در این بررسی می‌توان انتظار داشت که میزان باروری پس از واریکوسلکتومی افزایش یابد.

یکی از تستهای کاربردی مطرح شده در مقالات، HOST است. در بررسیهای انجام شده توسط Jeyendran و Check به ترتیب میزان واکنش مثبت کمتر از ۶۰ درصد یا کمتر از ۵۰ درصد به عنوان غیر طبیعی بودن HOST در نظر گرفته شده است (۸). لذا با توجه به این که میانگین پاسخ هایپوسموتیک مثبت در هر سه مرحله بررسی بیش از ۶۰ درصد بوده و در مورد کلیه بیماران به صورت منفرد نیز پاسخ مثبت بالاتر از ۶۰ درصد بود؛ چنین نتیجه می‌گیریم که واریکوسل در سلامت غشای اسپرم اختلاف

References

- Jacob RA: Congenital anomalies of the testis and scrotum in: Walsh R, Vaughan W (eds). Campbell's urology from: WB Saunders Company 1998; 3: 2186-2188
- Lenzi A, Gandini L, Bagolan P, Nahum A, Dondero F: Sperm parameters after early left varicocele treatment. Fert Steril 1998; 69(8): 343-349
- Mathews GJ, Mathews ED, Goldstein M:

Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Fert and Steril* 1998; 70(1): 71-75

4. Micheal C: Evaluation of the infertile males in: Management of urologic disorders, from wolfe, Robert R (ed). 1994, pp 24-40

5. Marks, Sturt S: Male infertility, in walsh R, Vaughan W, Campbell's urology from WB Saunders company. 1998, pp 1313-1314

6. DY DU-Plessis YP, Nayudu PI, Johnston WIH and Bade HWG: The use of in vitro fertilization to evaluate tests of human sperm function. *Fert Steril* 1988; 49, 272-277

7. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thomeycroft HI: Time course of hypo-osmotic swelling of human spermatozoa: Evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod* 1998; 13(6): 1578-1583

8. Check JH, Luric D, Baker A, Karsoff D, Benfer K: Transfer of cryopreserved embryos improved pregnancy rates in patients with damage to the functional integrity of the sperm memberane as measured by the hypo-osmotic swelling test. *Fert Steril* 1996; 65(6): 1241-1243

9. Dudoun JP, Mayaur MJ, hard G, Moscoto ML: Correlation between defects of chromatin

condensation of human spermadtozoa by anilineblue and semen characteristics. *J Androl* 1988; 20: 211-217

۱۰. افلاطونیان عباس، سلیمانی مهرداد، کریمی الهه: تستهای عملکرد اسپرم انسان و باروری خارج رحمی. انتشارات فردا، صفحات ۹-۱۹

11. Chan JP, Corsell VJ, Patton CW, Jacobson DJ, King A: Heat-Induced hyperactivation. *J Assist Reprod and Genet* 1998; 15: 32-38

12. Haidal G, Maass C, Schill WB: When to treat varicocele *Acta Chirurgica Hungarica* 1994; 34: 390-314

۱۳. رعیت شهربانو: رنگ آمیزی اسپرماتوزوئید با آنیلین یلو و مقایسه بین میزان رنگ پذیری اسپرمها با میزان لقاح خارج رحمی IVF. پایان نامه کارشناسی ارشد بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۱۳۷۶، صفحات ۴۰-۵۰

14. Belmonte IG, Serrano MN: Partial obstruction of the seminal path a ferquent cause of oligozoospermia in men. *Hum Reprod* 1998, 13(12): 3402-3405

15. Lobo A, Michell JR, Paulson RJ, Shoup D: Infertility contraception and reproductive endocrinology. 4ed, Blackwell Science U.S.A, 1997, Part(3), pp 552-553

16. Liu Dey, Baker CH, Gordon W: Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fert Steril* 1992; 58: 465-483

